

Aus dem Pathologischen Institut des Krankenhauses Westend

Direktor: Professor Dr. Volker Becker

**Die Beeinflussung der TCA—Calcitonin-Aktivität
durch Retroplazentars Serum und Cystinaminopeptidase
(Oxytocinase)**

Inaugural—Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den Medizinischen Fachbereichen

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

EBERHARD LASSEN

aus Pillau

1971

Aus dem Pathologischen Institut des Krankenhauses Westend
Direktor: Professor Dr. Volker Becker

**Die Beeinflussung der TCA—Calcitonin-Aktivität
durch Retroplazentarserum und Cystinaminopeptidase
(Oxytocinase)**

Inaugural—Dissertation
zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
EBERHARD LASSEN
aus Pillau



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548824_0037

Aus dem Pathologischen Institut des Krankenhauses Westend
Direktor: Professor Dr. Volker Becker

**Die Beeinflussung der TCA–Calcitonin-Aktivität
durch Retroplazentarserum und Cystinaminopeptidase
(Oxytocinase)**

Inaugural–Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
EBERHARD LASSEN
aus Pillau

Referent: Prof. Dr. V. Becker

Korreferent: Prof. Dr. P. Siegmund



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 4.12.1971

	Seite
EINLEITUNG	4
METHODIK	
1. Isolierung von TCA-Calcitonin	9
2. Partielle Reinigung der Oxytocinase	12
3. Bestimmung des Proteingehaltes	13
4. Bestimmung des Serum-Calciums	14
5. Bestimmung der Oxytocinaseaktivität	18
6. Tierversuche	19
ERGEBNISSE	
1. Biologische Aktivität der TCA-Calcitonin-Extrakte	21
2. Untersuchungen mit Schwangerenserum	24
3. TCA-Calcitonin-Inaktivierung durch männliches Serum und Retroplazenta- tarserum	25
4. TCA-Calcitonin-Inaktivierung durch vorgereinigte Oxytocinase	28
DISKUSSION	30
1. Enzymatische Spaltung von Oxytocin und Calcitonin	33
2. Calciumstoffwechsel in der Schwanger- schaft	36
3. Physiologische Wirkung des Calci- tonins	38
ZUSAMMENFASSUNG	43
LITERATURVERZEICHNIS	44

EINLEITUNG

Die Vorstellungen über die innersekretorische Steuerung des Calciumstoffwechsels beruhten seit der Darstellung aktiver Extrakte aus Nebenschilddrüsen durch HANSON (1924) und COLLIP (1925) auf der Annahme, daß Parathormon allein den Calciumstoffwechsel spezifisch beeinflusse. Ein Absinken des Serum-Calciums würde zu einer vermehrten Ausschüttung von Parathormon und damit zu einer erhöhten Calcium-Resorption aus dem Knochengewebe führen, eine Hypercalcämie dagegen die Parathormonfreisetzung aus den Epithelkörperchen hemmen (McLEAN 1957).

Zweifel an diesem negativen Rückkopplungsmechanismus (vgl. RASMUSSEN 1961) ließen Experimente aufkommen, bei denen Schilddrüsen-Nebenschilddrüsenpräparate mit calciumreichen Blut durchströmt wurden (COPP, DAVIDSON und CHENEY 1961; KUMAR, FOSTER und McINTYRE 1963). Es fand sich dabei ein erheblich schnellerer Abfall des Calciumspiegels als nach Entfernung der Epithelkörperchen. Neben dem hypercalcämisch wirkenden Parathormon mußte demnach noch ein calciumsenkendes Prinzip gebildet werden, dem COPP, DAVIDSON und CHENEY (1961) den Namen "Calcitonin" gaben und als Bildungsstätte die Nebenschilddrüsen ansahen.

Zwei Jahre nach der hypothetischen Forderung eines calciumsenkenden Hormons bemerkten HIRSCH, GAUTHIER und MUNSON (1963), daß das schnelle Absinken des Serum-Calciumspiegels vor allem dann eintrat, wenn statt der Epithelkörperchen die Schilddrüse zur Sekretion gereizt wurde (durch Elektrokoagulation). Den

Beweis der Existenz eines calciumsenkenden Prinzips lieferte die erfolgreiche Extraktion des Hormons aus Schilddrüsen (HIRSCH, VOELKEL und MUNSON 1964), das in Anlehnung an den von COPP geprägten Ausdruck Thyreocalcitonin genannt wurde. Durch immunhistochemische Untersuchungen (BUSSOLATI und PEARSE 1967; KRACHT 1968) konnten als Bildungsort für Calcitonin die parafollikulären C-Zellen (NONINDEZ 1932) der Schilddrüse nachgewiesen werden.



Abb. 1 C-Zellen der Schilddrüse

Die Nomenklatur dieses zuerst von BABER (1876) als "parenchymatöse Zelle" beschriebenen Zelltyps ist vielfältig. PEARSE (1966) stellte 29 Bezeichnungen zusammen, unter denen Begriffe wie parafollikuläre, interfollikuläre, interstitielle, protoplasmareiche und mitochondrienreiche Zellen die geläufigsten sind. Wegen ihrer Eigenschaft als Calcitoninbildner schlug PEARSE (1966) den Namen C-Zellen vor.

Sie sind ontogenetisch anderen Ursprungs als die Thyreoidea. Einerseits wurden sie als aus dem Thymus eingewanderte neurohormonale Zellen angesehen (SUNDER-PLASSMANN 1939), andererseits gliederte man sie in das System der diffusen endokrinen epithelialen Organe (ALTMANN 1940) ein. Ihr ultimobrachialer Ursprung wurde zuerst von GODWIN (1937) vermutet und von CARVALHEIRA und PEARSE (1967) immunfluoreskopisch bewiesen. Die Extraktion von Calcitonin aus den Ultimobrachialkörpern von Hühnern und Fischen, die bei diesen Spezies von der Schilddrüse getrennt liegen, gelang COPP, COCKKROFT und KUEH (1967). Auch in den branchiogenen Organen Thymus und Parathyreoidea des Menschen wurden C-Zellen nachgewiesen (GALANTE und GUDMUNDSSON 1968).

Wegen mehrerer gemeinsamer histochemischer Eigenschaften mit anderen polypeptidhormonbildenden Zellen werden die C-Zellen einem übergeordneten Zellsystem eingegliedert (PEARSE 1966). Es zeichnet sich neben Argyrophilie, hoher Cholesterinesteraseaktivität und Metachromasie vor allem durch die Aufnahme und Speicherung von DOPA und dessen Decarboxylierung zu Dopamin aus (APUD ¹⁾ Zellen, PEARSE 1966).

Da Calcitonin ein Hormon des Ultimobrachialkörpers ist und nicht nur in der Thyreoidea gebildet wird, scheint es schon wegen des kürzeren Namens angebracht, statt Thyreocalcitonin die ursprünglich von COPP geprägte Bezeichnung "Calcitonin" beizubehalten.

1) APUD = amin precursor uptake and decarboxylation

Calcitonin stellt ein einheitliches Peptid aus 32 Aminosäuren mit einer innermolekularen 1-7-Disulfidbrücke dar. Die Struktur konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen sowohl für das Schweinecalcitonin als auch für das menschliche Hormon aufgeklärt und durch Synthese einer aktiven Substanz gesichert werden (BELL, BARG, COLUCCI, DAVIES, DIOBKOWSKI, ENGLER, HEYDER, PAUL und SNEDECKER 1968; BREWER, KEUTMANN, REISFELD, MUNSON, SCHLUETER und POTTS 1968; POTTS, NIALI, KEUTMANN, BREWER und DEFTOS 1968; RINIKER, BRUGGER, KAMBER, RITTEL, SIEBER, NEHER 1969).

Obwohl menschliches und Schweinecalcitonin nur 14 gemeinsame Aminosäuren besitzen, zeigen beide Hormone ein nahezu gleiches, für die biologische Wirkung essentielles, zyklisches N-terminales Heptapeptid (Abb. 2b). Die biologische Aktivität des Hormons ist an die Integrität der ringbildenden Disulfidbrücke gebunden, denn die Sprengung und nachfolgende Alkylierung der SH-Gruppen führt zu völligem Wirkungsverlust (BREWER, KEUTMANN, REISFELD, MUNSON, SCHLUETER und POTTS 1968). Nach Alkylierung des Tryptophanrestes tritt ebenfalls eine Aktivitätseinbuße ein.

Die bisher an Calcitonin durchgeführten Untersuchungen befaßten sich vor allem mit den Problemen der Isolierung, der Strukturaufklärung und Synthese sowie mit den biologischen Wirkungen des Hormons unter normalen und pathologischen Bedingungen. Über seine Inaktivierung, seinen Abbau und seine Elimination aus dem Organismus liegen nur wenige Ergebnisse vor. TASHJIAN und VOELKEL (1968) konnten nach der Inkubation von TCA-Calcitonin mit Ratten- und menschlichen Seren innerhalb

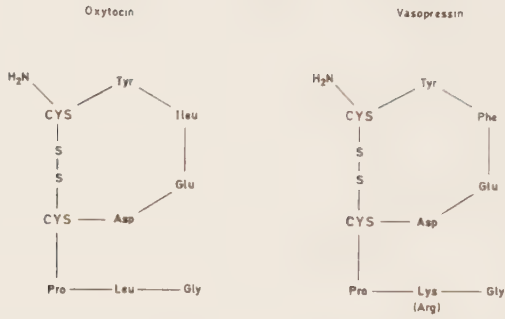


Abb. 2a

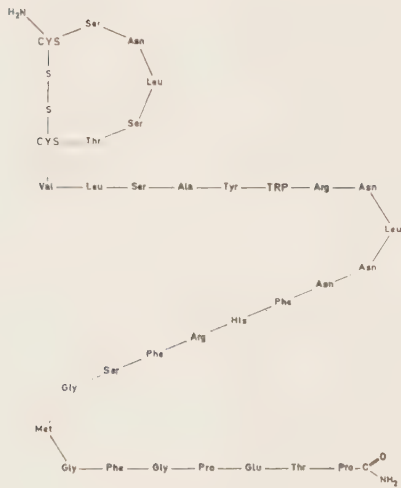


Abb. 2b

(Schweine-) Calcitonin

kurzer Zeit einen der Serumkonzentration entsprechenden Aktivitätsverlust nachweisen. Das aktivierende Prinzip des Serums ließ sich mit Ammoniumsulfat fällen und chromatographisch in zwei Fraktionen unterschiedlicher Inaktivierungsfähigkeit auf trennen. Fraglich blieb aber die chemische Beschaffenheit des inaktivierenden Prinzips.

Auf Grund der auffälligen Ringbildung der N-terminalen Aminosäuren des Calcitonins, die sich in ähnlicher Form auch bei den im Hypophysenhinterlappen gebildeten Hormonen Oxytocin und Vasopressin findet (Abb. 2a), kann vermutet werden, daß Fermente, die letztere Hormone spalten, auch zu einer Inaktivierung des Calcitonins führen. Ein solches Enzym stellt die im Syncytiotrophoplasten der Placenta gebildete und vermehrt im Schwangerenserum vorhandene Oxytocinase bzw. Cystinamino-peptidase (EC 3.4.1.2.) dar (WERLE und EFFKEMANN 1941; TUPPY und NESVADBA 1957; SJÖHOLM 1964; SJÖHOLM und YMAN 1967; SEELIG und ROEMHELD 1969).

Im Falle einer enzymatischen Spaltung des Calcitonins durch Serumproteasen müßte gerade die an der aktiven Gruppe angreifende Cystinaminopeptidase des Schwangeren- und Retroplazentarserums zu einer gegenüber Normalserum erhöhten Inaktivierung führen.

METHODIK

1. Isolierung von TCA-Calcitonin:

Schweineschilddrüsen wurden während des Schlachtens gesammelt,

bei -18° C tiefgefroren und in Trockeneis verpackt verschickt. Die Verarbeitung des Materials erfolgte im Kühlraum bei 0° C. Die Schilddrüsen wurden sorgfältig vom Bindegewebe, Fett und teilweise anhaftenden Epithelkörperchen befreit, zerkleinert und im Starmix unter Vermeidung von Hitzeentwicklung grob homogenisiert.

Je 2 kg Homogenat wurden mit 10 l Aceton vermischt und durch ein mehrschichtiges Leinentuch filtriert. Dieser Vorgang wurde 10mal mit Aceton, 5mal mit Chloroform und 10mal mit Aceton bis zur völligen Entfettung und Trocknung des Pulvers wiederholt. Das Schilddrüsenpulver wurde in Plastiktüten zu je 250 g verpackt und bei -18° C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Die Calcitonin-Extraktion wurde in Anlehnung an die von TENENHOUSE, ARNAUD und RASMUSSEN (1965) beschriebene Methode zur Parathormonextraktion durchgeführt.

An Reagenzien für eine Charge (500 g Trockenpulver) wurden verwendet:

Aceton	21000 ml
Diäthyl-Äther, peroxydfrei	27000 ml
Eisessig	5000 ml
Essigsäure 20 %	2500 ml
Trichloressigsäure 45 %	500 ml
HCL 0,2 M Lösung	5000 ml
NaCl 1 M	140 ml
Harnstoff	2402,6 g
Cystein	63,5 g
Na Cl	125,0 g

Jeweils 500 g Schilddrüsenpulver wurden mit 5000 ml einer Lösung aus 8 M Harnstoff, 0,1 M Cystein und 0,2 M HCl eine Stunde extrahiert. Anschließend wurden 5000 ml Aceton und 5000 ml Eisessig zugegeben und 30 min kräftig gerührt. Danach blieb die Lösung eine Stunde stehen. Unter Rühren wurden dann 15000 ml Aceton und 140 ml 1 M NaCl zugegeben. Nach Absetzen des Präzipitates wurde die Mischung durch ein mehrschichtiges Leinentuch filtriert und das Präzipitat verworfen.

Die 30000 ml Extraktionslösung wurde mit 25000 ml peroxyd-freiem Diäthyl-Äther versetzt und ausgiebig gemischt. Nach Absetzen des Präzipitates wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt, das Präzipitat zweimal mit Äther/Aceton (1:1 Vol/Vol) gewaschen und in einer Kühlzentrifuge bei 0° C abzentrifugiert. Danach wurde das Präzipitat in 2500 ml 20 % Essigsäure und 0,01 M Cystein gelöst und 40 min gerührt. Unter starkem Rühren wurde NaCl bis zu einer Konzentration von 5 % zugegeben (zu 2500 ml Lösung 125 g NaCl). Es bildete sich ein Niederschlag, der mit 3000 U/min 15 min lang abzentrifugiert und verworfen wurde.

Dem Überstand wurde soviel 45 % Trichloressigsäure (TCA) zugefügt, bis eine 7,5 % Konzentration erreicht war. Das TCA-Präzipitat wurde 10 min lang abzentrifugiert, zweimal mit 5 % TCA und einmal mit Äther gewaschen. Nach Abzentrifugieren wurde der überschüssige Äther abgegossen und der Rest im Vakuum entfernt, das TCA-Präzipitat in Aqua tridest. gelöst und gefriergetrocknet.

Das so erhaltene Präparat TCA-Calcitonin wurde zu sämtlichen Untersuchungen verwendet. Da die Chargen sich als genügend aktiv erwiesen, konnte auf eine weitergehende Reinigung vorerst verzichtet werden.

2. Partielle Reinigung der Oxytocinase:

Oxytocinase (Cystinaminopeptidase) wurde aus Retroplazentarserum nach TUPPY und WINTERSBERGER (1960) isoliert.

Als Reagenzien wurden verwendet:

- a) Retroplazentarserum
- b) Ammoniumsulfat
- c) Hyflo-Supercel
- d) Ammoniumbikarbonat 0,1 M Lösung
- e) Tris-HCl-Puffer 0,1 M Lösung

Zu 1000 ml Retroplazentarserum wurden 242 g Ammoniumsulfat gegeben (= 40 % Sättigung), 10 min bei 0° C gerührt, bei 0° C und 3000 U/min zentrifugiert und der Überstand anschließend mit 40 %er Ammoniumsulfatlösung auf 1020 ml aufgefüllt. In diese Lösung wurden 124 g Ammoniumsulfat eingerührt (= 60 % Sättigung), 30 g Hyflo-Supercel unter Rühren zugegeben und durch einen BÜCHNER-Trichter filtriert. Der Rückstand wurde mit Aqua dest. aufgeschwemmt, bei 0° C und 3000 U/min zentrifugiert, der Überstand anschließend 48 Std. im Kühlraum gegen Aqua dest. dialysiert und gefriergetrocknet.

Die Gefriertrocknung führt zu keiner Zerstörung der Enzymaktivität (SEELIG und RÖMHILD 1970).

500 mg des Lyophilisats wurden in 500 ml 0,1 M Ammoniumbikarbonat gelöst und nach 24stündiger Dialyse gegen das Lösungsmittel auf Sephadex G 200 (2,5 x 90 cm, Durchflußgeschwindigkeit 15 ml/h) mit 0,1 M Ammoniumbikarbonat chromatographisch aufgetrennt.

Die aktiven Fraktionen wurden gesammelt, 48 Std. bei 0° C gegen Aqua dest. dialysiert und anschließend gefriergetrocknet. 50 mg dieses Lyophilisats wurden in 300 ml 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7.4 gelöst und für die Inaktivierungsversuche verwendet.

3. Bestimmung des Proteingehalts:

Die Proteinbestimmung erfolgte nach KJELDAHL in einer Apparatur nach PARNASS und WAGNER.

Als Reagenzien wurden verwendet:

- a) Konzentrierte Schwefelsäure
- b) Katalysator: 10 % Kupfersulfat
- c) Borsäure-Indikator:

Lösung A: 1 % wässrige Methylenblaulösung

Lösung B: gesättigte Lösung von zweifach rückkristallisiertem Methylrot in 95 % Alkohol

Lösung C: 15 ml Lösung A + 125 ml Lösung B

Lösung D: 5 - 10 ml der Lösung C zu 2 l gesättigter Borsäurelösung

Für jede Analyse wurden 5 ml Lösung D und 5 ml Aqua dest. als Vorlage verwendet.

- d) Gesättigte NaOH-Lösung
- e) 0,014 n HCl-Lösung

10 mg des TCA-Calcitonins wurden in 10 ml n 0,2 HCl gelöst. In einem KJELDAHL-Kolben wurden 1 ml Probe, 2 ml konz. Schwefelsäure und 1 ml Kupfersulfat zusammen mit 2 - 3 Glasperlen verascht. Nach Abkühlung wurden zur Analyse 10 ml Aqua dest. und 9 ml Alkali zugegeben, in den Indikator überdestilliert und das Destillat mit 0,014 n HCl rücktitriert. Als Vergleich diente die Indikatorfarbe des Leerversuchs. Der Proteingehalt wurde aus dem Mittel von je drei Bestimmungen errechnet:

$$\text{mg Stickstoff} = \text{ml } 0,014 \text{ n HCl} \times 0,2$$

$$\text{Proteingehalt} = \text{mg N} \times 6,25 \text{ pro mg Pulver}$$

4. Bestimmung des Serum-Calciums:

Das Serum-Calcium wurde mit einer Titrationsmethode nach Angaben von MATTENHEIMER (1966) mit EDTA und Calcein als Indikator bestimmt.

Als Reagenzien wurden verwendet:

- a) Indikator: 25 mg Calcein wurden in 100 ml 0,25 n NaOH gelöst
- b) 1,25 n KOH
- c) 0,02 n wässrige EDTA-Lösung
- d) Standard: 250 mg CaCO_3 wurden in eben ausreichender Menge 10 % HCl gelöst und mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt.

Es hat sich nicht bewährt, KOH und Indikator im Verhältnis 1 : 10 zusammen in einem Mikrodosimeter (INGOLD) dem Serum zuzugeben, um Pipettierfehler auszuschalten, da zwischen beiden Partnern Reaktionen auftreten, die in Abhängigkeit von

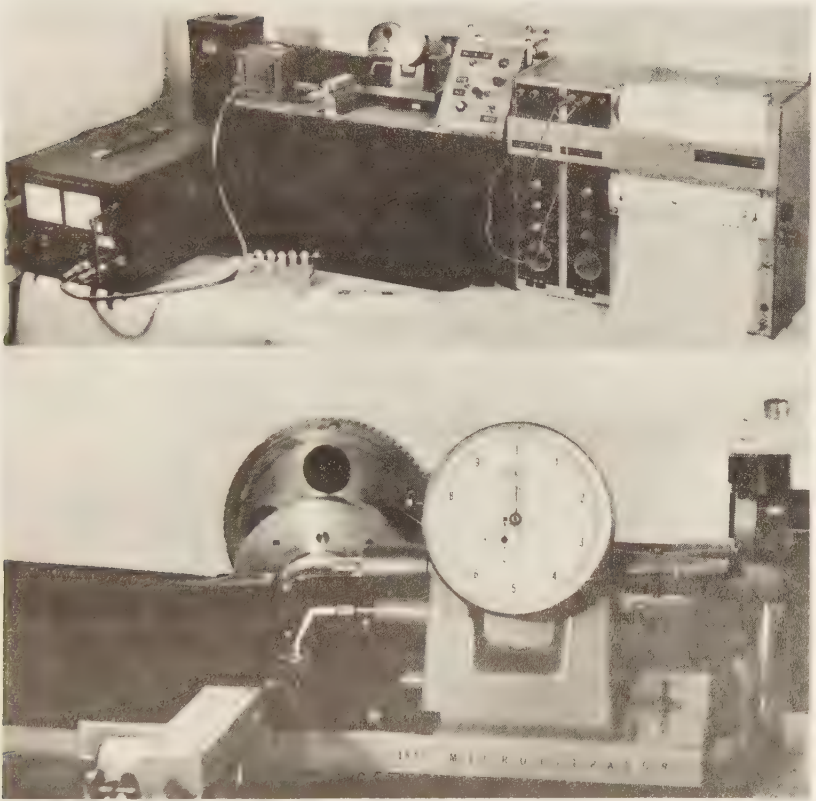


Abb. 3 Apparatur zur Calciumbestimmung (vgl. Schaltbild
Abb. 4) mit Ausschnittvergrößerung des Mikrotitrators

der Zeit des Zusammengebens verschiedene Ausgangswerte ergeben. Die Reagenzien wurden daher getrennt und erst unmittelbar vor der Messung in Einmal-Plastikküvetten einpipettiert:

100 /ul KOH
10 /ul Calcein
20 /ul Serum

Calcein, ein Kondensat aus Iminoessigsäure und Fluoreszein, bildet mit Calcium-Ionen einen gelb-grün fluoreszierenden Komplex. EDTA entreißt dem Calcein das Calcium unter Bildung eines Chelatkomplexes, wobei die Fluoreszenz erlischt. Die Fluoreszenzlöschung ist bei so geringen Serummengen mit dem Auge nicht zu bestimmen. Deshalb wurde das Streulicht der Fluoreszenz mit einem Photomultiplier gemessen und über einen Verstärker direkt auf einem Schreiber registriert.

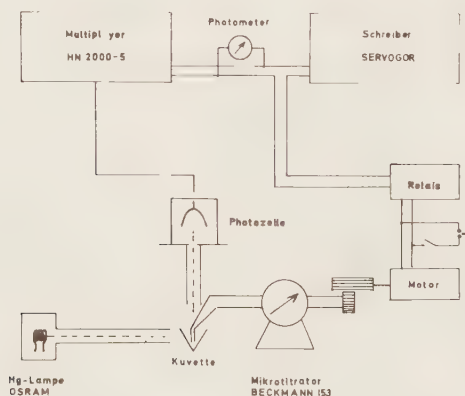


Abb. 4 Schaltbild

Titriert wurde mit dem BECKMANN-Mikrotitrator 153 mit Vibrationsmischer (Abb. 3). Als Antrieb diente ein Elektromotor, der über ein Relais mit dem Schreibereingang gekoppelt war (Abb. 4). Alle elektrischen Geräte wurden über einen Wechselspannungsstabilisator versorgt, um Ungenauigkeiten durch Spannungsschwankungen auszuschalten. Der genaue Titrationsendpunkt wurde graphisch ermittelt (Abb. 5).

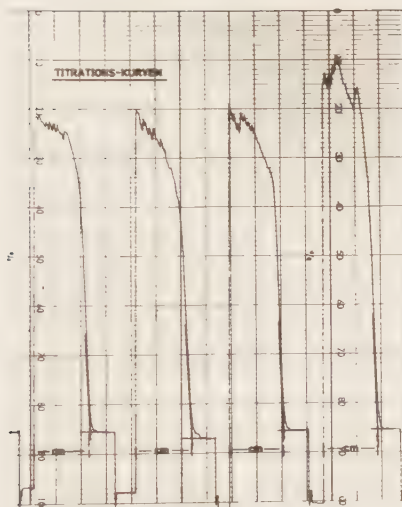


Abb. 5

Die Meßstrecke der Proben wurde verglichen mit einer Standardlösung (10 mg % Ca), die jeweils vor und nach der fünffachen Bestimmung einer Serumprobe gemessen wurde. Der Calciumwert des Serums errechnet sich aus

$$\text{Serum-Calcium (mg/100 ml)} = \frac{\text{Serum} - L \text{ (cm)}}{\text{Standard} - L \text{ (cm)}} \times 10$$

Der Reagenzienleerwert (L) betrug im Mittel $0,33 \pm 0,08$ cm = 8,25 % der Standardlösung und konnte vernachlässigt werden, zumal die Serumwerte eines Tieres durch Differenzbildung miteinander verglichen wurden.

5. Bestimmung der Oxytocinase-Aktivität:

Die Oxytocinase-Aktivität der Seren wurde nach der von SEELIG (1970) angegebenen Mikromethode bestimmt. Die Cystinaminopeptidase (Oxytocinase) spaltet die Peptidbindung des L-Cystin-di- β -Naphthylamids (CBNA), das wie Oxytocin, Vasopressin und Calcitonin einen N-terminalen Halbcystinrest aufweist. Das aus dem Substrat freigesetzte β -Naphthylamin wird nach der BRATTON-MARSHALL-Methode (1939) mit Natriumnitrit diazotiert und das Naphthylidiazoniumsalz mit N-(1-Naphthyl)-äthylendiamin in einen blauen Farbstoff umgewandelt, der photometrisch bestimmt werden kann.

Als Reagenzien wurden verwendet:

- a) Pufferlösung: 400 ml 0,2 M Tris-HCl-Puffer pH 7.4 werden mit 100 ml Aqua dest. auf 500 ml verdünnt.
- b) Substratlösung: 135 mg Cystin-di- β -Naphthylamid in 100 ml 0,01 n HCl lösen. Die Lösung ist vier Wochen in der Kälte haltbar.
- c) 30 ml Aceton p.A. + 60 ml 1 n HCl
- d) 0,1 % wässrige Natriumnitritlösung
- e) 0,5 % wässrige Ammoniumsulfaminlösung
- f) 0,1 % wässrige N-(1-Naphthyl)-äthylendiaminlösung
- g) 10 % Trichloressigsäure

Der Reaktionsansatz wurde nach Tabelle I durchgeführt. Die Messung der Extinktionen erfolgte im Zeiss-Spektro-Photometer PMQII bei einer Wellenlänge von 570 nm.

Tabelle I	Reaktionsansatz	Werte in μ l
Puffer		50
Serum		10
Substrat		20
2 Stunden bei 37° C inkubieren		
Trichloressigsäure		100
gut mischen und zentrifugieren		
Überstand		20
Aceton/HCl		100
in abgedunkeltem Raum (Rotlicht) zugeben		
Natriumnitrit		10
Ammoniumsulfaminat		10
N-Naphthyl-äthylendiamin		10
2 Stunden Entwicklung der Farbe bei 37° C im Dunkeln		

6. Tierversuche:

Die calciumsenkende Wirkung des Calcitonins wurde an männlichen Ratten (200 - 250 g) geprüft. Zwei Tage vor Versuchsbeginn erhielten die Tiere nur Aqua dest. ad libitum. Jedem Tier wurde nur einmal TCA-Calcitonin injiziert, um eine spä-

tere Beeinflussung durch mögliche Antikörperbildung gegen das TCA-Calcitonin zu vermeiden. Aus Mangel an Tieren eines Inzuchtstammes waren wir gezwungen, auf die bei anderen Autoren angegebene Bestimmung des Leerwertes an größeren Tierreihen zu verzichten.

Statt dessen wurde von einem Tier jeweils vor und nach der TCA-Calcitonin-Injektion der Calciumwert des Serums bestimmt. Dieses Vorgehen hat den Vorteil, daß die Serumcalciumwerte vor und nach der TCA-Calcitoninapplikation am gleichen Tier verglichen werden können.

In Äthernarkose wurden jedem Tier 0,5 ml Blut in leichtlaufenden Glasspritzen durch Herzpunktion entnommen. Die Mortalität konnte nach einiger Übung auf 2 - 3 % gesenkt werden. Noch während der Narkose wurde jeder Ratte 1 ml der zu prüfenden Lösung subcutan injiziert. Als Lösungsmittel wie auch zur Verdünnung der Seren wurde 0,1 M TRIS-HCl-Puffer pH 7.4 verwendet. 60 min nach der Injektion wurde zum zweiten Male 0,5 ml Blut entnommen, in EPPENDORF-Mikrolitergefäße gegeben und 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum vorsichtig abpipettiert und bis zur Calciumbestimmung im Kühlschrank aufbewahrt.

Zur Ermittlung der Serum-Calciumsenkung wurde 0,25 mg bzw. 0,5 mg TCA-Calcitonin, bezogen auf den Proteingehalt, subcutan injiziert. Das Material war in Trispuffer gelöst und zwei Stunden bei 37° C inkubiert worden. Als Vorversuch wurden Schwangerenserum (mensX) und männliches Serum in Verdünnungen von 1 : 10 mit je 0,25 mg/ml TCA-Calcitonin zwei

Stunden bei 37° C inkubiert. Zur Feststellung der verschiedenen TCA-Calcitonin-Inaktivierungsfähigkeit wurden männliches Humanserum und Retroplazentarserum in Verdünnungen von 1 : 20, 1 : 30 und 1 : 40 sowie 30fach verdünntes weibliches Normalserum mit je 0,25 mg TCA-Calcitonin versetzt und zwei Stunden bei 37° C inkubiert. Die aus Retroplazentarserum hergestellten Oxytocinaseanreicherungen wurden derart verdünnt, daß die Enzymaktivität der des verdünnten Retroplazentarserums entsprach.

ERGEBNISSE

1. Biologische Aktivität der TCA-Calcitonin-Extrakte:

Aus dem mit Aceton und Chloroform extrahierten Schilddrüsenspulver wurde in vier getrennten Arbeitsschritten mit Harnstoff-HCl-Cystein das TCA-Calcitonin gewonnen (Tab. A).

Tabelle A

	Gewicht in g aus 500 g Trockenpulver	Proteingehalt (mg/mg)
Charge D	4,056	0,687
Charge E	4,833	0,612
Charge F	2,655	0,473
Charge H	2,235	0,473

Zur Prüfung der Aktivitäten wurden jeweils 0,25 mg/ml bzw. 0,5 mg/ml TCA-Calcitonin, bezogen auf den Proteingehalt der einzelnen Chargen, verwendet. Es wurden 45 Tiere untersucht.

In Tab. B₁ sind am Beispiel der Charge D die absoluten Serumcalciumwerte von 20 Tieren jeweils vor und eine Stunde nach der Injektion von 0,25 mg TCA-Calcitonin angegeben. Die Werte sind Mittelwerte aus je fünf Einzelbestimmungen, die Standardabweichung s₁ betrug im Mittel $\pm$ 0,15 mg%.

Tabelle B₁

Serumcalcium (mg %)	Serumcalcium 1 h nach Inj. von 0,25 mg TCA- Calcitonin (mg%)	mittl.Calcium- senkung (mg%)
9,33 $\pm$ 0,12	8,55 $\pm$ 0,08	- 0,78
9,86 $\pm$ 0,11	8,66 $\pm$ 0,19	- 1,20
9,82 $\pm$ 0,09	8,62 $\pm$ 0,13	- 1,20
9,92 $\pm$ 0,08	8,61 $\pm$ 0,11	- 1,31
9,77 $\pm$ 0,13	9,08 $\pm$ 0,14	- 0,70
11,37 $\pm$ 0,12	10,00 $\pm$ 0,16	- 1,37
9,57 $\pm$ 0,14	9,00 $\pm$ 0,11	- 0,57
9,73 $\pm$ 0,20	8,80 $\pm$ 0,19	- 0,93
10,09 $\pm$ 0,14	9,36 $\pm$ 0,06	- 0,73
10,35 $\pm$ 0,24	9,47 $\pm$ 0,19	- 0,88
10,17 $\pm$ 0,19	9,23 $\pm$ 0,23	- 0,93
10,13 $\pm$ 0,26	9,08 $\pm$ 0,17	- 1,05
9,88 $\pm$ 0,18	9,38 $\pm$ 0,13	- 0,50
10,35 $\pm$ 0,15	9,52 $\pm$ 0,24	- 0,83
10,28 $\pm$ 0,13	9,52 $\pm$ 0,19	- 0,76
9,71 $\pm$ 0,03	8,91 $\pm$ 0,16	- 0,80
9,86 $\pm$ 0,03	9,13 $\pm$ 0,21	- 0,73
9,47 $\pm$ 0,13	8,59 $\pm$ 0,11	- 0,88
10,50 $\pm$ 0,13	8,54 $\pm$ 0,21	- 1,96
10,14 $\pm$ 0,20	9,34 $\pm$ 0,13	- 0,80

In gleicher Weise wurden die übrigen Messungen durchgeführt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Aufstellung der Einzelwerte verzichtet und nur die mittlere Calciumsenkung mit der Anzahl der Tierversuche angegeben.

Eine Std. nach der Injektion von 0,25 mg TCA-Calcitonin der Chargen D und E zeigte sich eine durchschnittliche Senkung des Serumcalciumspiegels um 0,93 - 0,97 mg% (vgl. Tab. B₂ und Abb. 6). Es ergab sich eine eindeutige Signifikanz im Calciumabfall ($p < 0,02$; ermittelt nach dem t-Test). Diese Chargen wurden für die weiteren Inaktivierungsversuche in einer Dosis von 0,25 mg/Tier verwendet, da eine Steigerung auf 0,5 mg/Tier keine weitere Senkung ergab.

Bei Kontrollversuchen mit Tris-Puffer, männlichem und Schwangerenserum zeigte sich keine Differenz des Serumcalciumspiegels. Auf eine weitere chromatographische Reinigung wurde wegen der signifikanten Senkung des Serumcalciums verzichtet. Die biologische Aktivität der Chargen D und E entsprach angenähert 0,5 MRC-Einheiten¹⁾ pro mg.

- 1) Diese Einheit wurde vom MEDICAL RESEARCH COUNCIL (Department of Biological Standards, London) nach einem von KUMAR, SLACK, EDWARDS, SOLIMAN, BAGHDIANZ, FOSTER und McINTYRE 1965 gewonnenen Standard festgelegt. Als 1 MRC-Einheit gelten 40 mg gefriergetrockneten Materials mit einem Proteingehalt von 25 %.

Tabelle B₂

	Dosis (mg/Tier)	mittlere Calcium-Senkung (mg%)	Anzahl der Tierversuche
Charge D	0,25	0,93 ± 0,31	20
Charge E	0,25	0,97 ± 0,36	9
	0,50	0,97 ± 0,35	10
Charge F	0,25	0,69 ± 0,39	3
Charge H	0,25	0,56 ± 0,38	3

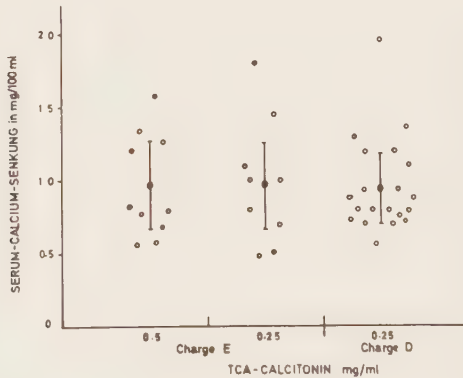


Abb. 6 Biologische Aktivität des TCA-Calcitonins

2. Untersuchungen mit Schwangerenserum:

Um einen ersten Überblick über eine mögliche Inaktivierung von TCA-Calcitonin zu erhalten, wurde Schwangerenserum (mens X) mit einer Enzymaktivität von $1,01 \times 10^{-2}$ μ Mol

CBNA/mg Protein mit 0,25 mg/ml TCA-Calcitonin zwei Stunden bei 37° C inkubiert. Bei einer Verdünnung von 1 : 10 zeigte sich ein Wirkungsverlust von 96 %, wohingegen männliches Serum gleicher Verdünnung nur zu 50 % zu inaktivieren vermochte (vgl. Tab. C).

Tabelle C Inkubation von TCA-Calcitonin mit männlichem und Schwangerenserum

	mittlere Calcium- senkung (mg %)	+) Inaktivierung (%)
Schwangerenserum (1 : 10 verdünnt)	0,04 ± 0,18	7 96
männliches Serum (1 : 10 verdünnt)	0,48 ± 0,15	4 50

+) Anzahl der Tierversuche

Der Versuch bestätigt den Befund von TASHJIAN und VOELKEL (1968), daß menschliches Serum TCA-Calcitonin inaktiviert.

3. TCA-Calcitonin-Inaktivierung durch männliches Serum und Retroplazentarserum:

Nach einer Inkubationsdauer von zwei Stunden bei 37° C mit männlichem Serum fand sich eine deutliche Minderung der Calcitoninwirkung, die sich umgekehrt proportional zu der Serumverdünnung verhielt. Bei 20facher Verdünnung ergab sich eine mittlere Senkung des Serumcalciums von 0,49 mg % gegenüber 0,93 mg % bei den Kontrollversuchen. 30fache Serumver-

dünnung führte nur noch zu 15 % Aktivitätsverlust des TCA-Calcitonins, und nach einer Verdünnung von 1 : 40 erreichte die Calciumsenkung die Werte des Kontrollversuches (vgl. Tab. D und Abb. 7a u. b).

Tabelle D Inkubation von TCA-Calcitonin mit männlichem und Retroplazentarserum

	Verdünnung (Trispuffer)	mittl. Calcium- senkung (mg %)	+) ++)	
			(%)	
Kontrollversuch	-	0,93 $\pm$ 0,31	29	0
männliches Serum	1 : 20	0,49 $\pm$ 0,15	7	47
	1 : 30	0,79 $\pm$ 0,23	4	15
	1 : 40	0,95 $\pm$ 0,38	7	-2
Retroplazentar- Serum	1 : 20	0,00 $\pm$ 0,03	5	100
	1 : 30	0,05 $\pm$ 0,13	4	95
	1 : 40	0,71 $\pm$ 0,15	5	24
weibliches Serum	1 : 30	0,78 $\pm$ 0,51	5	16

+) Anzahl der Tierversuche

++) Inaktivierung

Nach der Inkubation mit Retroplazentrarserum zeigte TCA-Calcitonin eine signifikant höhere Aktivitätseinbuße als mit männlichem Serum in den entsprechenden Verdünnungen. Bei 20- und 30facher Serumverdünnung trat stets ein vollständiger Wirkungsverlust ein. Auch bei Verdünnungen von 1 : 40 blieb 25 % der ursprünglichen Aktivität erhalten gegenüber 100 % bei entsprechend verdünnten männlichen Seren. Weibliches Normalserum verhält sich wie männliches Serum (vgl. Tab. D

und Abb. 7a u. b).

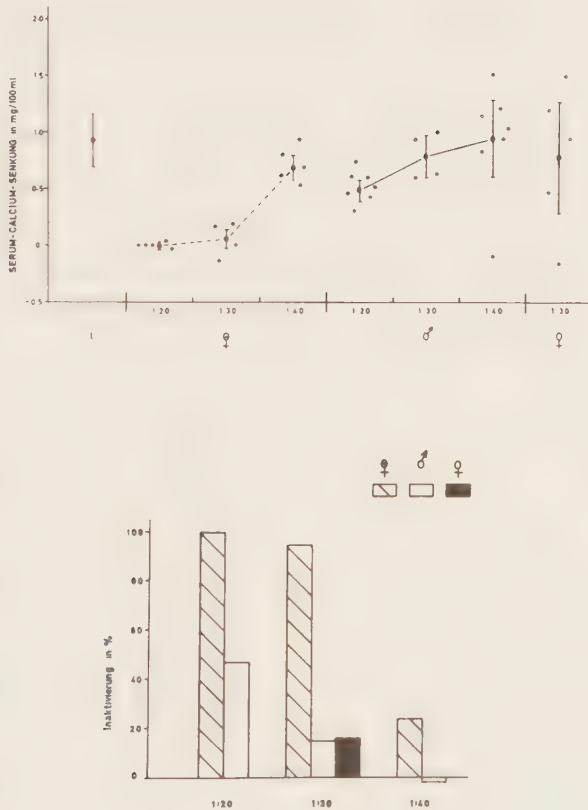


Abb. 7a u. 7b

Serum-Calciumsenkung und TCA-Calcitonin-Inaktivierung nach Inkubation mit Retroplazentars serum (♀), männlichem (♂) und weiblichem (♀) Normalserum verschiedener Verdünnung. L = Kontrollversuch mit TCA-Calcitonin.

4. TCA-Calcitonin-Inaktivierung durch vorgereinigte
Oxytocinase:

Die Enzymaktivitäten der zur Inaktivierungsprüfung verwendeten Seren ist aus Tabelle E zu entnehmen. Im Schwangeren- und Retroplazentarserum fand sich mit $1,01 \times 10^{-2}$ μMol gespaltenem CBNA/mg Protein eine 14fach höhere Enzymaktivität als im männlichen und weiblichen Normalserum.

Durch Ammoniumsulfatfällung und anschließende chromatographische Auftrennung auf Sephadex G 200 konnte eine 14,5fache Steigerung der Oxytocinaseaktivität erhalten werden (vgl. Tab. E).

Tabelle E Oxytocinaseaktivität der Seren

	$\mu\text{Mol CBNA}/$ $\text{ml}/2 \text{ h}$	Protein- gehalt (mg/ml)	$\mu\text{Mol CBNA}/$ $\text{mg Protein}/2 \text{ h}$
Schwangerenserum	0,609	60,10	$1,011 \times 10^{-2}$
männliches Serum	0,045	63,60	$0,071 \times 10^{-2}$
weibliches Serum	0,043	64,75	$0,066 \times 10^{-2}$
Retroplazentarserum	0,510	49,63	$1,02 \times 10^{-2}$
nach Ammonium- sulfatfällung	0,466	12,38	$3,76 \times 10^{-2}$
nach Chromato- graphie	0,118	0,76	$14,50 \times 10^{-2}$

Zur Prüfung einer eventuellen Abhängigkeit der Inaktivierungsfähigkeit des Retroplazentarserums von der Oxytocinaseaktivität wurde die lyophilisierte vorgereinigte

Oxytocinase derart mit Tris-Puffer verdünnt, daß seine Aktivität in etwa der der Retroplazentarserums entsprach. Nach Inkubation mit TCA-Calcitonin ergab sich ein annähernd gleicher Inaktivierungsgrad durch vorgereinigte Oxytocinase wie durch Retroplazentarserum (vgl. Tab. F und Abb. 8).

Tabelle F Inkubation von TCA-Calcitonin mit Retroplazentarserum und vorgereinigter Oxytocinase

	Calciumsenkung (mg%)	+) Inakti- vierung %	/uMol CBNA/ ml Serum/2 h
Retroplazentar- serum (1 : 30)	0,05 $\pm$ 0,13	4 95	1,9 x 10 ⁻²
vorgereinigte Oxytocinase	0,07 $\pm$ 0,08	4 93	1,8 x 10 ⁻²
Retroplazentar- serum (1 : 40)	0,71 $\pm$ 0,15	5 24	1,4 x 10 ⁻²
vorgereinigte Oxytocinase	0,63 $\pm$ 0,36	4 32	1,2 x 10 ⁻²

+) Anzahl der Tierversuche

Die prozentuale Inaktivierung von TCA-Calcitonin in Abhängigkeit von der Oxytocinaseaktivität des Retroplazentarserums wie auch der signifikant stärkere Wirkungsverlust im Vergleich zu männlichem Serum spricht für eine Beteiligung der Oxytocinase beim Abbau des Calcitonins. Auffällig bleibt jedoch die relativ starke Inaktivierung von TCA-Calcitonin durch männliches Serum mit vergleichsweise geringem Oxytocinasegehalt. Es müssen daher neben der

Oxytocinase noch weitere Calcitonininaktivatoren im Serum vorhanden sein.

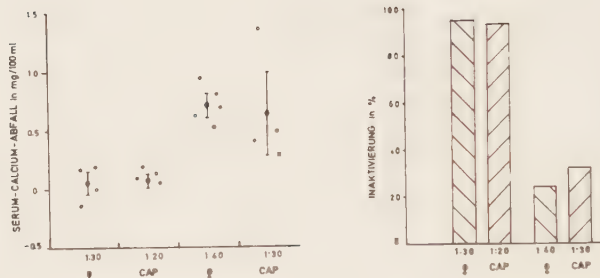


Abb. 8 Inaktivierung durch Retroplazentarserum (♀) und vorgereinigter Oxytocinase (CAP) entsprechender Enzymaktivität

DISKUSSION

Das von den ultimobranchiogenen C-Zellen in die Blutbahn sezernierte, den Serumcalciumspiegel senkende Calcitonin besitzt eine kurze Halblebenszeit. Es muß daher im Organismus rasch abgebaut oder eliminiert werden.

Prinzipiell sind folgende Möglichkeiten denkbar:

1. Abbau oder Inaktivierung durch spezifische Fermente oder Inhibitoren am Effektororgan (Knochengewebe)
2. Enzymatische Inaktivierung im Blutplasma

3. Enzymatische Spaltung oder Maskierung in der Leber

4. Ausscheidung des Hormons durch die Niere

Einschlägige Untersuchungen über den Abbau des Calcitonins liegen bisher nur vereinzelt vor. TASHJIAN und VOELKEL (1968) konnten durch Inkubation von TCA-Calcitonin mit Rateten- und Humanserum eine der Serumkonzentration entsprechende Aktivitätseinbuße nachweisen. Das inaktivierende Prinzip ließ sich mit Ammoniumsulfat fällen und chromatographisch in zwei Fraktionen unterschiedlicher Inaktivierungsfähigkeit auftrennen (Abb. 9a). Eine weitere Klassifizierung konnte aber noch nicht erreicht werden. Ein Wirkungsverlust durch die unspezifische Leucinaminopeptidase wurde ausgeschlossen (PUTTER, KAZKA, HARMAN, RICHES, KEMPF, CHALET, ROTHROCK, WASE und WOLF 1967).

Untersuchungen von ALDRED und SCHLUETER (1969) bestätigen die Inaktivierung von TCA-Calcitonin durch menschliches Serum. Auffälligerweise trat bei Anwendung höher gereinigten Calcitonins (12 MRC-Einh./mg) eine Inaktivierung allein durch Inkubation mit Tris-Puffer pH 7.5 und Na-Acetat-Puffer pH 5.5 ein, während das grobgereinigte TCA-Calcitonin erst nach Serumzugabe inaktiviert wurde. Diese Stabilität gegenüber Tris-Puffer beruht möglicherweise auf der Anwesenheit stabilisierender Faktoren im TCA-Calcitonin. Inwieweit es sich um Proteine wie Albumin handelt, kann noch nicht entschieden werden.

Auch bei unseren Versuchen mit TCA-Calcitonin konnten

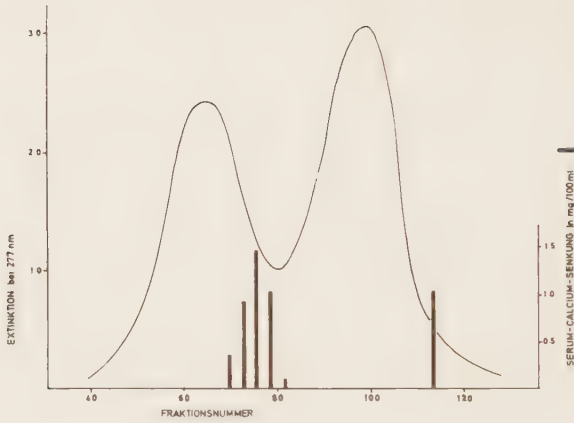


Abb. 9a Elutionsdiagramm von Rattenserum nach Ammonium-sulfatfällung und Chromatographie mit TCA-Cal-citonin inaktivierenden Eiweißfraktionen (verändert nach TASHJIAN und VOELKEL)

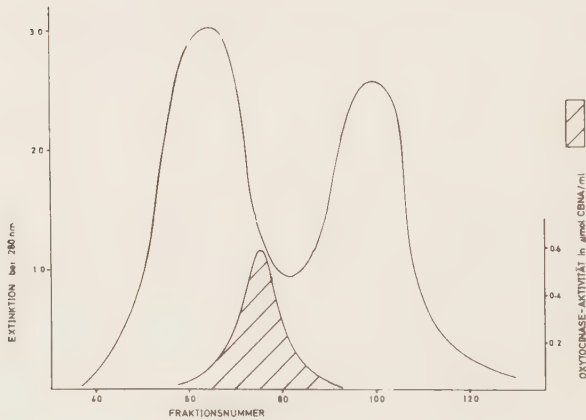


Abb. 9b Elutionsdiagramm von Retroplazentarserum nach Ammoniumsulfatfällung und Chromatographie mit Eiweißfraktionen hoher Oxytocinaseaktivität

wir keinen Wirkungsverlust durch Tris-Puffer beobachten.

Unsere bisherigen Ergebnisse bestätigen grundsätzlich die von TASHJIAN und VOELKEL (1968) erhobenen Befunde. Daneben fand sich aber nach der Inkubation mit Retroplazentarserum eine wesentlich stärkere Inaktivierung des TCA-Calcitonins als nach Vorbehandlung mit männlichen und weiblichen Normalseren. Eine noch stärkere Inaktivierungspotenz zeigte die aus Retroplazentarserum vorgereinigte Oxytocinase selbst. Ein Vergleich der Elutionsdiagramme des nach Ammoniumsulfatfällung von Rattenserum auf Sephadex G 200 von TASHJIAN und VOELKEL (1968) erhaltenen Eluates mit dem Diagramm des ebenso behandelten Retroplazentarserums zeigt eine Übereinstimmung des einen inaktivierenden Prinzips mit den Fraktionen höchster Oxytocinaseaktivität (Abb. 9a und 9b).

Die Hypothese der Inaktivierung des Calcitonins durch Oxytocinase erhält hierdurch eine weitere Stütze.

1. Enzymatische Spaltung von Oxytocin und Calcitonin:

Im Prinzip können wir für das Calcitonin einen ähnlichen enzymatischen Abbau durch die Oxytocinase fordern, wie er für die Hormone Oxytocin und Vasopressin gefunden wurde. Die Oxytocinase spaltet die Peptidbindung zwischen dem N-terminalen Halbcystin- und dem benachbarten Tyrosinrest des Oxytocins bzw. Vasopressins (TUPPY und NESVADBA 1957). Bei dieser hydrolytischen Spaltung konnte in größeren Mengen Cystin nachgewiesen werden (SJÖHOLM 1964). Nach längerer Einwirkung

der Oxytocinase fanden sich die durch schrittweisen Abbau des Oxytocinmoleküls freiwerdenden Aminosäuren (SJÖHOLM 1967).

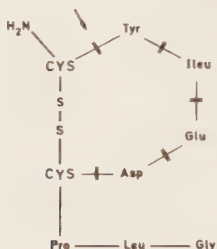
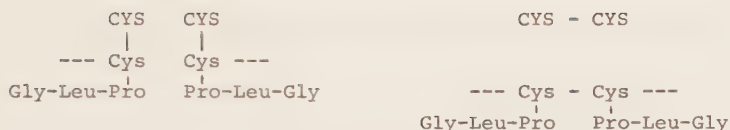


Abb. 10 Enzymatischer Abbau des Oxytocins durch Oxytocinase

Nur die Aminosäuren Prolin und Leucin konnten nicht nachgewiesen werden, was vermutlich an der Unangreifbarkeit des Penta-peptids Cys-Cys-Pro-Leu-Gly liegt, da die Iminogruppe des Prolins die entsprechenden Hydrolyseschritte blockiert (SJÖHOLM 1967). Da jedoch freies Cystin im Spaltprodukt von Oxytocin und Vasopressin nachgewiesen wurde (SJÖHOLM und YMAR 1967) und ferner eine Spaltung der Disulfidbrücke durch die Amino-peptidase Oxytocinase wahrscheinlich nicht eintritt, läßt sich die Anwesenheit von freiem Cystin im Inkubationsgemisch dadurch erklären (SJÖHOLM 1967), daß sich zwei schon teilweise abgebaute Peptidringe durch Umlagerung der Schwefelbrücken unter Freisetzung der beiden N-terminalen Halbcystinreste nach folgendem Schema verbinden:



Beim Calcitonin führt die Spaltung und anschließende Alkylierung der Disulfidbrücke zum völligen Verlust der biologischen Aktivität (BREWER, KEUTMANN, REISFELD, MUNSON, SCHLUETER und POTTS 1968), ebenso die Alkylierung des Tryptophanrests. Die Freisetzung von Cystin bedarf beim Calcitonin nicht der Interpretation durch die von SJÖHOLM (1967) aufgestellte Theorie, da am Ringende keine blockierende Iminogruppe mit dem Cystinrest verbunden ist.

Sollte bei der Inaktivierung des Calcitonins durch eine Cystinaminopeptidase ebenso wie bei Vasopressin und Oxytocin unter den Spaltprodukten freies Cystin nachgewiesen werden, ließe sich mit der Bestimmung des freigesetzten Cystins eine einfache enzymatische Methode zur Standardisierung des Calcitonins entwickeln, und die zur Zeit noch notwendige biologische Messung der Calciumsenkung könnte unterbleiben.

Neben Oxytocinase bzw. Cystinaminopeptidase müssen aber noch weitere inaktivierende Faktoren im Serum vorliegen, denn männliches Serum zeigte eine relativ hohe Inaktivierungspotenz. Wäre die Inaktivierung von TCA-Calcitonin in männlichem Serum nur durch Oxytocinase hervorgerufen, so dürfte bei den niederen Aktivitäten im Vergleich zu Retroplazentarserum keine Inaktivierung eintreten.

2. Calciumstoffwechsel in der Schwangerschaft:

Die Calcitonininaktivierung durch die in der Schwangerschaft vermehrt gebildete Oxytocinase impliziert die Frage, ob und in welchem Maße ein erhöhter Calcitoninabbau den Calciumstoffwechsel in der Schwangerschaft beeinflusst.

Der gesteigerte Calciumbedarf in der Schwangerschaft ist seit langem bekannt. Eine Reihe von Symptomen wird als Ausdruck eines weitverbreiteten Calcium-Mangels gewertet: Der Verlust eines Zahnes pro Schwangerschaft, der zehnfach erhöhte Kariesbefall von Schwangeren gegenüber gleichaltrigen Nichtschwangeren, die gesteigerte neuromuskuläre Erregbarkeit, der erhöhte Bedarf an Analgetika unter der Geburt, besonders bei Frauen mit einem Calciumspiegel unter 8 mg %, Verlängerung der QT-Strecke im EKG, büschelweiser Haarausfall und allerdings selten vorkommende Tetanien (WESPI 1961; ROTH 1961).

Die Senkung des Calciumspiegels während der Schwangerschaft mit dem tiefsten Wert (im Mittel -1,35 mg %) im 7. bis 8. Monat konnte ausreichend belegt werden (NEWMAN 1947; ALBRIGHT und REIFENSTEIN 1948; ROTH 1961; KERR, LOKEN, GLENDENING, GORDAN und PAGE 1962). Lediglich ALBERS (1953) will eine Erhöhung des Gesamtcalciums im Serum festgestellt haben.

Mit einem täglichen Bedarf von 100 mg Calcium verbraucht der Fet während der gesamten Schwangerschaft etwa 27 g Calcium; mit den 3 g in der Plazenta eingelagerten Calciumsalzen entspricht dies nur 3 - 4 % der Kalkreserve des mütterlichen Skeletts (ROTH 1961). Selbst bei fehlender Calciumsubstitution

kann in Anbetracht der großen Kalkreserve die Senkung des Serumcalciums durch den vermehrten Bedarf nicht allein erklärt werden.

Eine erhöhte renale Calciumausscheidung sowie eine Einschränkung der intestinalen Resorption durch Vitamin-D-Mangel wurden ausgeschlossen (ROTH 1961; KERR 1962). Abweichungen in der Parathormonbildung und -sekretion wurden nicht beobachtet. Umstritten ist der Einfluß der Calciumsubstitution:

Während HARDY (1956) mit täglichen oralen Gaben von Calciumlaktat und KERR (1962) mit phosphatfreiem Calciumcarbonat nach 4 - 5 Wochen eine Normalisierung des Calciumspiegels beobachteten (calciumphosphatreiche Diät vermindert die Calciumresorption, PAGE und PAGE 1953), konnte ROTH (1961) auch mit täglicher intravenöser Substituierung keine Normalisierung des Calciumspiegels von Schwangeren erreichen. Oral gegebenes Calcium wurde zwar ausreichend resorbiert, aber sofort zur Auffüllung des Kalkdepots ins Knochengewebe eingelagert.

Ein vermehrter Calciumeinstrom ins Skelettsystem und damit eine Senkung des Serumcalciums kann durch Östrogene bedingt sein, die die Osteoblastentätigkeit und damit den Knochenanbau anregen. Die ebenfalls während der Schwangerschaft vermehrt gebildeten Glukokortikoide können durch Einschränkung der intestinalen Calciumresorption an der Hypocalcämie beteiligt sein (ROTH 1961).

Der Einfluß einer vermehrten Inaktivierung von Calcitonin auf den Serumcalciumspiegel während der Schwangerschaft kann nicht

ohne nähere Erläuterung der biologischen Wirkung des Hormons diskutiert werden.

3. Physiologische Wirkung des Calcitonins:

Die selektive Durchströmung der Schilddrüse mit calciumreichem Blut führt zu einer von der Dauer des hypercalcämischen Reizes abhängigen Verringerung des Serumcalciums (CARE 1965). Das Calcitonin wird in den parafollikulären C-Zellen in so reichlichem Maße gespeichert (MATSUAWA und KURUSOMI 1967), daß auch nach stundenlanger Durchströmung der Schilddrüse mit calciumreichem Blut keine Erschöpfung der Calcitoninsekretion bemerkt wurde (CARE 1967).

Für die Calcitoninsekretion wird in Analogie zur Freisetzung von Parathormon ein negativer Rückkopplungsmechanismus angenommen. Die geringe Sekretionsrate bei normalem Calciumspiegel wird erst bei größeren Schwankungen erhöht (MINKIN und TALMAGE 1968; CARE, COOPER, DUNCAN und ORIMO 1968).

Calcitonin hemmt die Calciumabgabe aus dem Knochengewebe (FRIEDMAN und RAISZ 1965). Nach vorheriger Calciummobilisierung durch Parathormon wird der Effekt noch verstärkt (ALIAPOULIOS, GOLDBABER und MUNSON 1966). Eine Beeinflussung der renalen Calciumausscheidung und der intestinalen Resorption konnte ausgeschlossen werden (HIRSCH, VOELKEL und MUNSON 1964; ALIAPOULIOS 1965; MILHAUD und MOUKTAR 1966).

Eine Förderung der Calciumaufnahme ins Knochengewebe durch Calcitonin ist zwar bei in vitro Versuchen nicht beobachtet

worden, für diese Möglichkeit sprechen aber die Zunahme der Knochenformation ganz junger Ratten nach langfristigen Calcitoninungen sowie die Beseitigung der Osteoporosis nach hohen Dosen von Vitamin A durch Langzeitbehandlung mit Calcitonin (FOSTER, DOYLE, BORDLER und MATRAJT 1966; FOSTER, CLARK, DOYLE, JOPLIN, FRASER und MCINTYRE 1968).

Beim gesunden Erwachsenen zeigen Calcitoninungen kaum einen Effekt, da die Hormonwirkung stark abhängig von der Knochenresorptionsrate ist (COPP und KUCZERPA 1968). Bei Patienten mit osteolytischen Knochenkrankheiten trat aber nach Calcitoninungen deutliche Besserung ein (MILHAUD 1968).

Genauere Vorstellungen über den Mechanismus der Resorptionshemmung lassen sich zusammen mit der Betrachtung der antagonistischen Parathormonwirkung gewinnen. Neben verstärkter renaler und intestinaler Calciumresorption (BUCHANAN 1961; CRAMER 1963) steigert das Nebenschilddrüsenhormon die Osteoklastentätigkeit und die Osteolyse (TOFT und TALMAGE 1960; BELANGER, ROBICHON, MIGICOVSKY, COPP und VINCENT 1963). Vermutlich regt Parathormon die RNS-Synthese an (PARK und TALMAGE 1968; OWEN und DINGHAM 1968), die auf eine vermehrte Bildung osteolytischer Fermente hindeutet. Jedenfalls kann die calciumsteigernde Wirkung des Parathormons durch Gaben von Actinomycin D, das als Antibioticum die RNS-Synthese blockiert, gehemmt werden (RASMUSSEN, ARNAUD und HAWKER 1964; RAISZ und NIEMANN 1967). Die Calcitoninwirkung wird anscheinend nicht von Actinomycin beeinflusst (TASHJIAN 1965).

Nach einer Hypothese von WELLS und LLOYD (1968) bestimmt die Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat (AMP), das als intrazellulärer Vermittler vieler Hormonwirkungen angesehen wird (SUTHERLAND 1966), die Calciummobilisierungsrate und damit den Serum-Calciumspiegel. Die Wirkung des Parathormons soll nach dieser Theorie in einer verstärkten Synthese von zyklischem AMP durch Aktivierung der Adenylcyclase (CHASE und AURBACH 1968) bestehen, während Calcitonin durch Stimulierung der Phosphodiesterase das zyklische Adenosinmonophosphat reduzieren könnte. Die beiden Hormone würden also antagonistisch über den zyklischen AMP-Spiegel die Bildung osteolytischer Fermente beeinflussen und so durch Hemmung und Aktivierung der Calciummobilisierung den Serumcalciumspiegel kontrollieren.

Für die Parathormonwirkung scheint diese Hypothese recht gut gesichert (CHASE, FEDAK und AURBACH 1969), für die Calcitoninwirkung jedoch zweifelhaft, denn die gleichen Autoren konnten eine Beeinflussung der Phosphodiesterase und der Adenylcyclase durch Calcitonin in vitro ausschließen.

Auch besteht kein reiner Antagonismus zwischen beiden Hormonwirkungen, denn Parathormon übernimmt zweifelsohne die Hauptrolle in der Kontrolle des Serumcalciumspiegels. Wegen der Schnelligkeit seiner Freisetzung, Wirkung und Eliminierung wird Calcitonin aber als Feinregulator im Calciumgleichgewicht angesehen (TALMAGE, NEUENSCHWANDER und RAISZ 1965; CARE, DUNCAN und WEBSTER 1967; BRONNER, SAMMON, NICHOLS STACEY und SHAH 1968). Der genaue Angriffspunkt des Calcitons am Knochengewebe ist noch nicht bekannt.

Außer diesen beiden Hormonen ist noch ein dritter Mechanismus für die Kontrolle des Calciumgleichgewichtes verantwortlich, der den Austausch von Calcium- und Phosphationen zwischen dem Knochengewebe und dem Extrazellulärraum auf Grund des Physikochemischen Gleichgewichts regelt. Er hält auch bei Ausfall beider Hormone den Serumcalciumspiegel in verträglichen Grenzen (Abb. 11).

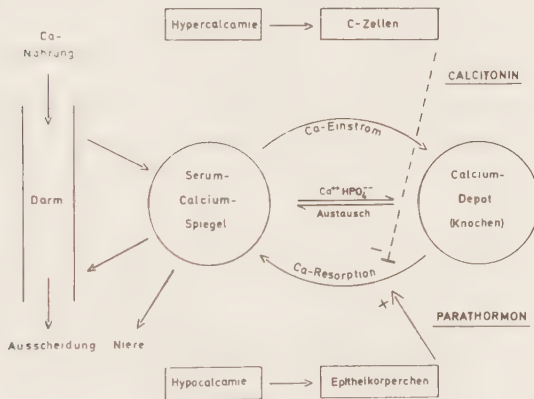


Abb. 11 Faktoren zur Kontrolle des Calciumgleichgewichts (schematisch, Vit.D ist aus Gründen besserer Übersichtlichkeit nicht berücksichtigt)

An der vor allem im letzten Drittel der Schwangerschaft erniedrigten Calciumstoffwechsellage sind, wie oben erwähnt wurde, mehrere Faktoren beteiligt.

Eine verstärkte Inaktivierung des Calcitonins durch Oxytocinase würde eine leichtere Calciumfreisetzung ermöglichen, um dem Feten auf jeden Fall genügend Calciumsalze zur Verfügung

zu stellen. Dies müßte zwar zu einer Steigerung der Knochenresorptionsrate, aber nicht unbedingt zu einer erhöhten Calciumkonzentration im mütterlichen Serum führen, da ja ein großer Bedarf an Calciumsalzen durch den Feten und die Plazenta besteht.

Der erhöhte Abbau des Calcitonins könnte einen Reiz auf die Zellen zur beschleunigten Sekretion ausüben und damit über eine verstärkte Syntheseleistung zu einer Hypertrophie der C-Zellen führen. Eine Vermehrung der parafollikulären Zellen in der Gravidität ist bisher noch nicht beschrieben worden. Auch könnte man dem entgegenhalten, daß die bestehende Hypocalcämie dem Reiz der verstärkten Calcitoninbildung entgegenwirkt.

Ob Calcitonin überhaupt eine wesentliche Rolle im Calciumstoffwechsel der Schwangerschaft spielt, ist noch nicht untersucht worden. Das Hormon scheint nur zur Feinregulierung des Calciumspiegels zu dienen. Bei der in der Schwangerschaft bestehenden Hypocalcämie würde Calcitonin, wenn überhaupt, nur in sehr geringen Mengen in die Blutbahn sezerniert werden. Eine verstärkte Inaktivierung durch Oxytocinase würde deshalb nicht wesentlich in Erscheinung treten.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß keiner der oben besprochenen Faktoren allein eine befriedigende Erklärung für die Erniedrigung des Calciumspiegels im letzten Drittel der Schwangerschaft zu liefern vermag. Der erhebliche Kalkbedarf scheint nicht Hauptursache, sondern nur auslösendes Moment

der Hypocalcämie zu sein. Ein Zusammenspiel aller Faktoren führt zu einer erhöhten Mobilisierungsbereitschaft der Calciumreserve, damit der Fet unter allen Umständen seinen Kalkbedarf decken kann. Dabei ist der "Calciostat" (ROTH 1961) der Mutter um eine Stufe niedriger gestellt, ohne zu wesentlichen klinischen Ausfällen zu führen, solange das Gleichgewicht der regulatorischen Kräfte nicht gestört ist.

ZUSAMMENFASSUNG

Auf Grund struktureller Ähnlichkeiten der N-terminalen Bereiche von Calcitonin und Oxytocin wurden die Möglichkeiten einer Spaltung und Inaktivierung von Calcitonin durch die im Schwangerenserum reichlich vorhandene Oxytocinase untersucht. TCA-Calcitonin wurde mit männlichem Serum und Retroplazentars serum sowie vorgereinigter Oxytocinase in verschiedenen Verdünnungen zwei Stunden bei 37° C inkubiert. Die Aktivität wurde anhand der Senkung des Serumcalciumspiegels bei der Ratte überprüft. Es zeigte sich eine signifikant höhere Inaktivierung von TCA-Calcitonin durch oxytocinasereiche Seren als durch Normalseren, wobei sich der Inaktivierungsgrad proportional der Oxytocinaseaktivität verhielt. Auf Grund der relativ hohen Inaktivierungsfähigkeit des männlichen Serums bei sehr geringer Oxytocinaseaktivität kann aber die Oxytocinase bzw. Cystinaminopeptidase nicht als alleiniger Inaktivator angesehen werden.

Ein in der Schwangerschaft erhöhter Calcitoninabbau durch Oxytocinase hat wahrscheinlich keine Einwirkung auf die bestehende Hypocalcämie.

LITERATURVERZEICHNIS

- ALBERS, H.: Kritische Erwägungen und Analysen über das Gesamtcalcium im Serum gesunder Schwangerer. Zeitschr.f.Geburts-
hilfe und Gynäkolog., 139(1953), 23-32.
- ALBRIGHT, F., REIFENSTEIN, E.C.: The parathyroid glands and the
metabolic bone disease. Baltimore 1948.
- ALDRED, J.P., SCHLUETER, J.: Studies of thyrocalcitonin-
inaktivitation in vitro. Proc.soc.exper.biol.Med., 130(1969),
630-34.
- ALIAPOULIOS, M.A., GOLDHABER, P., MUNSON, P.L.: Thyrocalcitonin
inhibition of bone resorption induced by parathyroid
hormone in tissue culture. Science, 151(1966), 330-331.
- ALTMANN, H.-W.: Die parafollikuläre Zelle der Schilddrüse und
ihre Beziehungen zu den gelben Zellen des Darmes. Beitr.
path.Anat., 104(1940), 420-454.
- ANAST, C.S.: Thyreocalcitonin - a review. Clinical Orthopedics,
47(1966), 179.
- BABER, E.C.: Contributions to the minute anatomy of the thyroid
gland of the dog. Phil.Trans.roy.Soc.London 166 II(1876).
- BELANGER, L.F., ROBICHON, MIGICOVSKY, COPP, VINCENT: Resorption
without osteoclasts (osteolysis). in: Mechanisms of hard
tissue destruction, (1963), 531-556. Editor: Sognaes, Amer.
Assoc. of the Advancement of Science, Washington, D.C.
- BELL, P.H., BARG, W.F., COLUCCI, D.F., DAVIES, M.C., DZIOBKOWSKI, C.,
ENGLERT, M.E., HEXDER, E., PAUL, R., SNEDEKER, E.H.: Purification
and structure of porcine calcitonin-1. J.Amer.chem.Soc.,
90(1968), 2704.
- BRATTON, A.C., MARSHALL, E.K.: New coupling component for
sulfanilamid determination. J.biol.chem., 128(1939), 537-50.
- BREWER, H.B.: Isolation and chemical properties of porcine
thyrocalcitonin. J.biol.chem., 243(1968), 5739-47.
- BREWER, H.B., KEUTMANN, H.T., REISFELD, R., MUNSON, P., SCHLUETER, R.,
POTTS, J.T.: Role of sulfur-containing amino acids in the
biological activity of porcine thyrocalcitonin. Fed.Proc.,
27(1968), 690.
- BRONNER, F., SAMMON, P.T., NICHOLS, C., STACEY, R.E., SHAH, B.G.:
Thyrocalcitonin and plasma calcium homeostasis in the rat.
in: Parathyroid hormone and thyrocalcitonin, Excerpta med.

- found., (1968), 353-369.
- BUCHANAN, G.D.: Parathyroid influence on renal excretion of calcium. in: The parathyroids, 334-352, Edit.: Greep a. Talmage; Charles C. Thomas, Springfield, Ill.
- BUSSOLATI, G., CARVALHEIRA, A.F., PEARSE, A.G.E.: Immunofluorescence studies on the source of calcitonin, and the effect of immunization with calcitonin on the thyroid gland of the guinea-pig. Heinemann Medical Books, 133 (1968).
- BUSSOLATI, G., PEARSE, A.G.E.: Immunofluorescent localization of calcitonin in the C-cells of pig and dog thyroid. J. Endocr., 37 (1967), 205.
- CARE, A.D.: Sekretion of Thyrocalcitonin. Nature (London), 205 (1965), 1289.
- CARE, A.D.: Measurement of Thyrocalcitonin secretion rate by pig thyroid in vivo. Fed. proc., 26 (1967), 367.
- CARE, A.D., DUNCAN, D., WEBSTER, D.: Thyrocalcitonin and its role in calcium homeostasis. J. Endocr., 37 (1967), 155-67.
- CARE, A.D., COOPER, C.W., DUNCAN, T., ORIMO, H.: The direct measurement of thyrocalcitonin secretion rate in vivo. in: Parathyroid hormone and thyrocalcitonin, Excerpta med. found., (1968), 417-427.
- CARVALHEIRA, A.F., PEARSE, A.G.E.: Proceedings of the Symposium on thyrocalcitonin and the C-cells. Heinemann Medical Books, (1967) im Druck.
- CHASE, L., AURBACH, G.D.: Cyclic AMP and the mechanism of action of parathyroid hormone. in: Parathyroid hormone and Thyrocalcitonin, Excerpta med. found., (1968), 247-57.
- COLLIP, J.B.: The extraction of parathyroid hormone which will prevent or control parathyroid tetany and which regulates levels of blood calcium. J. biol. Chem., 63 (1925), 395.
- COPP, D.H., DAVIDSON, A.G.F., CHENEY, B.A.: Evidence for a new parathyroid hormone which lowers blood calcium. Proc. Canad. Fed. Biol. Soc., 4 (1961) 17.
- COPP, D.H., CAMERON, E.C., CHENEY, B.A., DAVIDSON, A.G., HENZE, K.G.: Evidence for calcitonin - a new hormone from the parathyroid that lowers blood calcium. Endocr., 70 (1962), 638.
- COPP, D.H., HENZE, K.G.: Parathyroid origin of calcitonin. Evidence from perfusion of sheep glands. Endocr., 75 (1964), 49.

- COPP,D.H.,COCKCROFT,D.W.,KUEH,Y.: Ultimobranchial origin of calcitonin. Hypocalcemic effect of extracts from chicken glands. *Canad.J.Physiol.*,45(1967),1095.
- COPP,D.H.,COCKCROFT,D.W.,KUEH,Y.: Calcitonin from ultimobranchial glands of dog, fish and chicken. *Science*,158(1967),924.
- COPP,D.H.,KUCZERPA,A.V.: A new bioassay for calcitonin and effect of age and dietary Ca and P on the response. Symposium on Thyrocalcitonin and the C-cells,Heinemann Med.,Juli(1967),18.
- COPP,D.H.: Parathyroid hormone, calcitonin and calcium homeostasis. in:Parathyroid hormone and thyrocalcitonin, *Excerpta med.found.*, (1968),25-39.
- CRAMER,C.F.: Participation of parathyroid glands in control of calcium absorption in dogs. *Endocr.*,72(1963),192.
- FOSTER,G.V.,CLARK,M.,DOYLE,F.H.,JOPLIN,G.F.,SINGER,F.R.,FRASER,T.R.,McINTYRE,J.: Clinical applications of calcitonin. in:Parathyroid hormone and thyrocalcitonin, *Excerpta med.found.*, (1968),100-107.
- FOSTER,G.V.,DOYLE,F.H.,BORDIER,P.,MATRAJT,H.: Effect of thyrocalcitonin on bone. *Lancet*,ii(1966),1428-1431.
- FRIEDMAN,J.,RAISZ,L.G.: Thyrocalcitonin:Inhibitor of bone resorption in tissue culture. *Science*,150(1965),1465-1467.
- GALANTE,L.,GUDMUNDSSON,T.V.,MATTHEWS,E.W.,TSE,A.,WILLIAMS,E.D.,WOODHOUSE,N.J.Y.,McINTYRE,J.: Thymic and parathyroid origin of calcitonin in man. *Lancet*,2(1968),537-538.
- GODWIN,M.C.: Complex IV in the dog with special emphasis on the relation of the ultimobranchial body to the interfollicular cell in the postnatal thyroid gland. *Amer.J.Anat.*,60(1937),299.
- HANSON,A.M.: The hydrochloric X of the bovine parathyroid and its phospho-tungstic acid precipitate. *Milit.Surg.*,54(1924),76.
- HARDY,J.A.: Blood-Calcium levels in pregnancy. *Obstrect.Gynec.* N.Y.,8(1956),565-566.
- HIRSCH,P.F.,GAUTHIER,G.F.,MUNSON,P.L.: Thyroid hypercalcemic principle and recurrent laryngeal nerve injury as factors affecting the response to parathyroidectomy in rats. *Endocr.*,73(1963),244.

- HIRSCH, P.F., VOELKEL, E.F., MUNSON, P.L.: Thyrocalcitonin: hypocalcemic hypophosphatemic principle of the thyroid gland. *Science*, 146(1964), 412-413.
- KERR, D.N.S., PAGE, E., LOKEN, H.F., GLENDENING, GORDAN, G.S.: Calcium and phosphordynamic in pregnancy. *Amer.J.Obstet. Gynec.*, 83(1962), 2-8.
- KRACHT, J., HACHTMEISTER, U., KRUSE, H.: Thyreocalcitonin und die C-Zellen der Schilddrüse. *Münchener Med.Wschr.*, 4(1968), 203-208.
- KRACHT, J.: Immunohistological studies on thyreocalcitonin in C-cells. *Endocr.*, 52(1968), 395-401.
- KUMAR, M.A., FOSTER, G.V., MCINTYRE, J.: Further evidence for calcitonin. A rapid-acting hormone which lowers plasma-calcium. *Lancet*, II(1963), 480.
- KUMAR, M.A., SLACK, E., EDWARDS, A., SOLIMAN, H.A., BAGHDIANZ, A., FOSTER, G.V., MCINTYRE, J.: A biological assay for calcitonin. *J.Endocr.*, 33(1965), 469.
- MCLEAN, F.D.: The parathyroid hormone and bone. *Clin.Orthop.*, 9(1957), 46.
- MATTENHEIMER, H.: Mikromethoden für das klinisch-chemische und biochemische Laboratorium. Walter de Gruyter & Co., Berlin 1966, 2.Aufl., 56-57.
- MATSUAWA, T., KROSUMI, K.: Morphological changes in the para-follicular cells of the rat thyroid glands after administration of calcium shown by electron microscopy. *Nature*, 213(1967), 927.
- MILHAUD, G.: Utilization of thyrocalcitonin in man in normal and pathological conditions. in: Parathyroid hormone and thyrocalcitonin. *Excerpta med.found.*, (1968), 86-99.
- MILHAUD, G., MOUKHTAR, M.S.: Thyrocalcitonin: effects on calcium kinetics in the rat. *Proc.Soc.exp.Biol.Med.*, 123(1966), 207.
- MINKIN, C., TALMAGE, R.V.: A study of secretion and function of thyrocalcitonin in normal rats. in: Parathyroid hormone and thyrocalcitonin. *Excerpta med.found.*, (1968), 339-352.
- NEWMAN: Serum electrolyt in pregnancy, parturition and puerperium. *Obstet.and Gynec.*, 10(1957), 51.
- NONIDEZ, J.F.: The origin of the para-follicular cell, a second epithelial component of the thyroid gland of the dog. *Amer.J.Anat.*, 49(1932), 479.

- O'RIORDAN, J.C.: Thyrocalcitonin: turnover studies. *J. Endocr.*, 43 (1969), lvi-lvii.
- O'RIORDAN, J.C., AURBACH, G.D.: Mode of action of thyrocalcitonin. *Endocr.*, 82 (1968), 377-383.
- OWEN, M., BINGHAM, P.J.: The effect of parathyroid extract on RNA-synthesis in osteogenic cells in vivo. in: Parathyroid hormone and thyrocalcitonin, *Excerpta med. found.*, (1968), 216-225.
- PAGE, E.W., PAGE, E.M.: *Obstet. Gynec.*, 1 (1953), 94.
- PARK, H., TALMAGE, R.V.: Comparison of the effects of calcium and endogenous parathyroid hormone on RNA-synthesis in rat bone. in: Parathyroid hormone and thyrocalcitonin, *Excerpta med. found.*, (1968), 203-215.
- PEARSE, A.G.E.: The cytochemistry of the thyroid C-cells and their relationship to calcitonin. *Proc. roy. soc. B*, 164 (1966), 478-487.
- PEARSE, A.G.E.: The thyroid parenchymatous cells of Baber and the nature and function of their C-cell successors. Thyrocalcitonin and the C-cells. *Heinemann Med. Books*, July (1967), 98.
- POTTS, J.T., BREWER, H.B., REISFELD, R.A., HIRSCH, P.F., SCHLUETER, R., MUNSON, P.L.: Isolation and chemical properties of porcine thyrocalcitonin. in: Parathyroid hormone and thyrocalcitonin, *Excerpta med. found.*, (1968), 54.
- POTTS, J.T., NIALL, H.D., KEUTMANN, H.T., BREWER, H.B., DEFTOS, L.J.: The amino acid sequence of porcine thyrocalcitonin. *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, 59 (1968), 1321.
- POTTS, Jr. J.T., BUCKLE, R.M., SHERWOOD, L.M., RAMBERG, C.F., MAYER, C.P., KRONFELD, D.S., DEFTOS, C.J., CARE, A.D., AURBACH, G.D.: Control of secretion of parathyroid hormone. in: Parathyroid hormone and thyrocalcitonin, *Excerpta med. found.*, (1968), 407-415.
- PUTTER, I., KACZKA, E.A., HARMAN, R.E., RICHES, E.L., KEMPF, A.J., CHAIET, L., ROTHROCK, J.W., WASE, Q.W., WOLF, F.J.: The isolation and properties of thyrocalcitonin. *J. Amer. chem. Soc.*, 89 (1967), 5301.
- RAISZ, L.G., NIEMANN, I.: Early effects of parathyroid hormone and thyroid-calcitonin on bone in organ culture. *Nature*, 214 (1967), 486.

- RASMUSSEN, H.: Parathyroid hormone: nature and mechanism of action. *Amer. J. Med.*, 30(1961), 112.
- RASMUSSEN, H., ARNAUD, C., HAWKER, C.: Actinomycin D and the response to parathyroid hormone. *Science*, 144(1964), 1019.
- RINIKER, B., NEHER, R., MAIER, R., KAHNT, F. W., BYFIELD, P. G. H., GUDMUNDSSON, T. V., GALANTE, L., MCINTYRE, J.: Menschliches Calcitonin: Isolierung und Charakterisierung. *Helv. chim. acta*, 51(1968), 1738.
- RINIKER, B., BRUGGER, M., KAMBER, B., RITTEL, W., SIEBER, P., NEHER, R.: Structure and synthesis of human calcitonin. *Biochem. J.*, 111(1969), 14.
- ROTH, F.: Die Hypocalcämie im letzten Drittel der Gravidität. *Arch. Gynäk.*, 194(1961), 493.
- SEELIG, H. P.: Mikromethode zur Bestimmung der Cystinaminopeptidase (Oxytocinase). *Klin. Wschr.* (1970), im Druck.
- SEELIG, H. P., ROEMHELD, R.: Untersuchungen zur histochemischen Lokalisation der Leucin- und Cystinaminopeptidase (Oxytocinase) in der Placenta. *Histochemie*, 18(1969), 30.
- SEELIG, H. P., RÖMHILD, B.: Einfluß der Lyophilisierung auf die Aktivität und histochemische Darstellbarkeit der Oxytocinase in Vorbereitung.
- SJÖHOLM, J.: Enzymatic inactivation of oxytocin. *Acta chemica scandinavia*, 18(1964), 889.
- SJÖHOLM, J.: Biochemical studies on oxytocin and oxytocinase. *Acta pharmaceutica Suecica*, 4(1967), 81-96.
- SJÖHOLM, J., YMAN, L.: Degradation of oxytocin, lysin-vasopressin, angiotensin II and angiotensin II-amid by oxytocinase. *Acta pharmaceutica Suecica*, 4(1967), 65.
- STOKLASA, E., WINTERSBERGER, E.: Zum Mechanismus des Oxytocin und Vasopressinabbaues durch Schwangerenserum. *Naunyn-Schmiedersbergs Archiv exp. path. Pharmacol.*, 236(1959), 358.
- SUNDER-PLASSMAN, P.: *Dtsche Zschr. Chirurgie*, 252(1939), 210.
- SUTHERLAND, E. W., ROBISON, G. A.: in: F. Morel: zyklisches Adenosinmonophosphat als zellulärer Vermittler vieler Hormonwirkungen. *Triangel (Sandoz)*, 9(1970), 119-126.
- TALMAGE, R. V., NEUENSCHWANDER, J., KRAINTZ, L.: Evidence for the existence of thyrocalcitonin in the rat. *Endocr.*, 76(1965), 103.
- TASHJIAN, A. H.: Homeostasis of plasmacalcium: effects of

- actinomycin D, parathyroidectomy and thyrocalcitonin. *Endocr.*, 77(1965), 375.
- TASHJIAN, A.H., VOELKEL, E.F.: Studies of the inactivation of thyrocalcitonin by serum. *Parathyroid hormone and thyrocalcitonin, Excerpta med. found.*, (1968), 108-118.
- TENENHOUSE, A., ARNAUD, C., RASMUSSEN, J.: The isolation and characterization of thyrocalcitonin. *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, 53(1965), 818.
- TOFT, R.F., TALMAGE, R.V.: Quantitative relationship of osteoclasts to parathyroid function. *Proc. soc. exp. Biol. Med. N.Y.*, 103(1960), 611.
- TUPPY, H., NESVADBA, H.: Über die Amino-peptidase-Aktivität des Schwangerenserums und ihre Beziehung zu dessen Vermögen, Oxytocin zu inaktivieren. *Monatshefte Chemie*, 88(1957), 977-988.
- TUPPY, H., WINTERSBERGER, E.: Reinigung und Eigenschaften der Serumoxytocinase. *Monatshefte Chemie*, 91(1960), 1001-1010.
- WELLS, H., LLOYD, W.: Possible involvement of cyclic AMP in the actions of thyrocalcitonin and parathyroid hormone. in: *Parathyroid hormone and thyrocalcitonin, Excerpta med. found.*, (1968), 332-333.
- WELLS, H.: Inhibition of the hypocalcemic action of thyrocalcitonin by theophyllin and isoproterenol. *Endocr.*, 82(1968), 468-474.
- WERLE, E., EFFKEMANN, G.: Über die oxytocinabbauende Fähigkeit des Schwangerenblutes. *Arch. Gynäkol.*, 171(1941), 286-290.
- WESPI, H.J.: Kropf- und Kariesverhütung in der Schwangerschaft. *Arch. Gynäkol.*, 195(1961), 378.
- YMAN, L., SJÖHOLM, J.: Some physiko-chemical properties of oxytocinase (cystinamino-peptidase). *Acta pharma. Suecica*, 4(1967) 13.
- Nachtrag:
- CHASE, L., FEDAK, S.A., AURBACH, G.D.: Activation of skeletal adenylcyclase by parathyroid hormone in vitro. *Endocrinol.*, 84(1969), 761-68.

Lebenslauf

Am 14. September 1944 wurde ich als Sohn des Kaufmannes Georg Lassen und seiner Ehefrau Käthe, geb. Jarke, in Pillau / Ostpreußen geboren.

Nach der Flucht im Januar 1945 wuchs ich in Flensburg auf und besuchte nach der Grundschule den altsprachlichen Zweig des Alten Gymnasiums zu Flensburg bis zur Reifeprüfung am 10. Februar 1964.

Nach einjährigem Grundwehrdienst bei der Bundesmarine begann ich in Heidelberg das Medizinstudium und bestand dort nach 5 Semestern am 20. Juli 1967 die ärztliche Vorprüfung.

Die ersten klinischen Semester verbrachte ich in Innsbruck, Kiel und Wien. Seit April 1969 studiere ich an der Freien Universität Berlin und möchte hier das medizinische Staatsexamen ablegen.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Volker Becker für die Überlassung des Themas dieser Dissertation herzlich danken.

Ganz besonderen Dank schulde ich Herrn Dr. med. Hans-Peter Seelig für seine wertvollen Anregungen und seine nimmermüde Unterstützung vor allem auch in kritischen Situationen.

Herrn cand. med. Bernhard Römhild danke ich für seine immer bereitwillige Hilfe bei den Tierversuchen und der Herstellung und Bestimmung der Oxytocinase.

